

Best Available Copy

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A) 昭63-196596

⑫ Int.Cl.

C 07 H 15/203
C 08 B 37/00
C 12 P 19/00

識別記号

厅内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)8月15日

7417-4C
6779-4C
7236-4B

※審査請求 未請求 発明の数 2 (全9頁)

⑭ 発明の名称 末端にイノシトール残基を結合したグルコオリゴ糖およびその製造方法

⑮ 特願 昭62-28996

⑯ 出願 昭62(1987)2月10日

⑰ 発明者 佐藤 充克 神奈川県藤沢市藤沢3341

⑰ 発明者 八木 佳明 神奈川県藤沢市藤沢5437-38

⑰ 発明者 石倉 知之 神奈川県茅ヶ崎市小和田1-22-32

⑰ 発明者 森田 博志 神奈川県厚木市森の里若宮7番1号 栗田工業株式会社総合研究所内

⑱ 出願人 栗田工業株式会社 東京都新宿区西新宿3丁目4番7号

⑲ 出願人 三楽株式会社 東京都中央区京橋1丁目15番1号

⑳ 代理人 弁理士 柳原 成

最終頁に統く

明細書

(Glc)_nGlc-Ino

(1)

1. 発明の名称

末端にイノシトール残基を結合したグルコオリゴ糖およびその製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) 一般式

(Glc)_nGlc-Ino

(1)

(式中、Glcはグルコース残基を表わし、Inoはイノシトール残基を表わし、nは0または1~7の整数を表わし、かつGlc-Glcは α -1,4-グリコシド結合を表わし、Glc-InoはGlcの1位水酸基とInoの水酸基によるグリコシド結合を表わす。) で示される末端にイノシトール残基を結合したグルコオリゴ糖。

(2) イノシトール残基がmyo-イノシトール由来するものである特許請求の範囲第1項記載のグルコオリゴ糖。

(3) サイクロデキストリンとイノシトールをサイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの存在下に反応させることを特徴とする一般式

(式中、Glcはグルコース残基を表わし、Inoはイノシトール残基を表わし、nは0または1~7の整数を表わし、かつGlc-Glcは α -1,4-グリコシド結合を表わし、Glc-InoはGlcの1位水酸基とInoの水酸基によるグリコシド結合を表わす。) で示される末端にイノシトール残基を結合したグルコオリゴ糖の製造方法。

(4) サイクロデキストリンが α -、 β -または γ -サイクロデキストリンである特許請求の範囲第3項記載の製造方法。

(5) イノシトールがmyo-イノシトールである特許請求の範囲第3項または第4項記載の製造方法。

(6) サイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼがバチルス・オーベンシス、バチルス・メガテリウム、バチルス・マセラニスまたはバチルス・サーキュラニス由来のものである特許請求の範囲第3項ないし第5項のいずれかに記載の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は末端にイノシトール残基を結合した新規かつ有用なグルコオリゴ糖およびその製造方法に関するものである。

〔従来の技術〕

近年、各種のオリゴ糖が生化学的試薬として提供され、例えばアミラーゼ活性測定基質、難う触性甘味料、ビフィドバクテリウム菌の増殖促進物質等として注目されている。

これらのうちアミラーゼ活性測定基質としては、マルトテトラオースまたはマルトペンタオースを対象とするもの(特開昭50-56998号)、ニトロもしくはハロゲン化芳香族配糖体を対象とするもの(特公昭61-78号)が知られている。また難う触性甘味料としては、ショーキロースにフラクトースが1~4分子結合したオリゴ糖(特開昭56-154967号)、ビフィドバクテリウム菌の増殖促進物質としては、 α -D-ガラクトーススピラノシル-(1→4)-[β -D-ガラクトスピラノシル-(1→6)]-D-グルコースからなるオリゴ糖(特開昭58-88497号)が知ら

れている。

一方、これらのオリゴ糖の中には、2種以上の糖に α -アミラーゼなどの酵素を作用させて製造する方法が提案されている(特公昭56-22520号)。

上記のオリゴ糖はそれぞれ異なる機能を有しており、製造の異なるオリゴ糖がそれぞれ多様な機能を有することがうかがわれる。従ってこのようなオリゴ糖の機能の多様性から、さらに新規なオリゴ糖およびその製造方法の開発が希求される。

〔発明の目的〕

本発明は上記のような要望に応えるためのもので、文献未載の新規なオリゴ糖であって、生化学的試薬としてのみでなく、アミラーゼ活性測定基質、ビフィドバクテリウム菌の増殖促進物質などとして有用なグルコオリゴ糖およびその製造方法を提案することを目的としている。

〔発明の構成〕

本発明は次の末端にイノシトール残基を結合したグルコオリゴ糖およびその製造方法である。

(1) 一般式



(式中、Glcはグルコース残基を表わし、Inoはイノシトール残基を表わし、nは0または1~7の整数を表わし、かつGlc-Glcは α -1,4-グリコシド結合を表わし、Glc-InoはGlcの1位水酸基とInoの水酸基によるグリコシド結合を表わす。)で示される末端にイノシトール残基を結合したグルコオリゴ糖。

(2) サイクロデキストリンとイノシトールをサイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの存在下に反応させることを特徴とする一般式



(式中、Glcはグルコース残基を表わし、Inoはイノシトール残基を表わし、nは0または1~7の整数を表わし、かつGlc-Glcは α -1,4-グリコシド結合を表わし、Glc-InoはGlcの1位水酸基とInoの水酸基によるグリコシド結合を表わす。)で示される末端にイノシトール残基を結合したグ

ルコオリゴ糖の製造方法。

本発明の第1発明に係るる末端にイノシトール残基を結合したグルコオリゴ糖は上記一般式(1)で示されるもので、Glcを残基とする1個のグルコース、または α -1,4-グリコシド結合した2~7個のグルコースオリゴマーの末端グルコースの1位の水酸基に、Inoを残基とするイノシトールの水酸基がグリコシド結合により結合したオリゴ糖である。グリコシド結合により結合するイノシトールの水酸基の位置は任意である。

一般式(1)で示されるオリゴ糖として次の化合物があげられる。

化合物(1)

イノシトール残基にグルコース残基がグリコシド結合した化合物(一般式(1)におけるn=0)。

化合物(2)

イノシトール残基にマルトース残基がグリコシド結合した化合物(一般式(1)におけるn=1)。

化合物(3)

イノシトール残基にマルトリオース残基がグ

リコシド結合した化合物（一般式〔I〕における $n = 2$ ）。

化合物(4)

イノシトール残基にマルトテトラオース残基がグリコシド結合した化合物（一般式〔I〕における $n = 3$ ）。

化合物(5)

イノシトール残基にマルトペンタオース残基がグリコシド結合した化合物（一般式〔I〕における $n = 4$ ）。

化合物(6)

イノシトール残基にマルトヘキサオース残基がグリコシド結合した化合物（一般式〔I〕における $n = 5$ ）。

化合物(7)

イノシトール残基にマルトヘプタオース残基がグリコシド結合した化合物（一般式〔I〕における $n = 6$ ）。

化合物(8)

イノシトール残基にマルトオクタオース残基が

アンスロン反応 隣性
を示す。

(C) 色調

上記各オリゴ糖は、乾燥粉末の形態ではいずれも白色である。

(D) 酸性、塩基性、中性の別

各オリゴ糖は、いずれも中性である。

(E) 赤外線吸収スペクトル

上記各オリゴ糖のうち、式〔I〕の $n = 0$ のオリゴ糖を KBr 調剤法により測定した赤外線吸収スペクトログラムは第 1 図に示す通りである。 $n = 1 \sim 7$ のオリゴ糖についても、ほぼ同位置に吸収帯が現われる。

(F) プロトン核磁気共鳴スペクトル

上記各オリゴ糖のうち、式〔I〕の $n = 0$ のオリゴ糖を重水 (D_2O) を溶媒として 270 メガヘルツで測定したプロトン核磁気共鳴スペクトログラムは第 2 図の通りである。

(G) ^{13}C 核磁気共鳴スペクトル

上記各オリゴ糖のうち、式〔I〕の $n = 0$ のオリ

グリコシド結合した化合物（一般式〔I〕における $n = 7$ ）。

一般式〔I〕において、Ino で表わされるイノシトール残基としては本発明の目的を達成できるものであれば、特定の異性体に限定されるものでないが、好適なものとしては、動物、植物や酵母などの微生物に広く見い出される myo-イノシトール由来の残基を挙げることができる。

本発明のグルコオリゴ糖の理化学的性質を示すと次のとおりである。

理化学的性質：

(A) 溶剤に対する溶解性

式〔I〕の $n = 0 \sim 7$ の各オリゴ糖とも水に可溶性であるが、アセトン、クロロホルムおよびベンゼンに不溶性であり、含水アルコールには難溶性である。

(B) 显色反応

式〔I〕の $n = 0 \sim 7$ の各オリゴ糖とも	
アンモニア・硝酸銀反応	陰性
フェノール・硫酸法	陽性

ゴ糖を、重水 (D_2O) を溶媒とし、トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム (TSP) を標準物質として、完全カップリング法により 68 メガヘルツで測定した ^{13}C 核磁気共鳴スペクトログラムは第 3 図に示す通りである。

(H) 比旋光度

同様に式〔I〕の $n = 0$ のオリゴ糖の比旋光度は、

$$[\alpha]_D^{25} + 82.70 \quad (C = 1.0, H_2O)$$

である。

(I) 組成糖の確認

(i) 式〔I〕で示されるオリゴ糖の n 数の確認は、被膜オリゴ糖を最終塩酸濃度が 1 N になるように調製した溶液とした後、沸騰条件下、約 90 分間処理することによりグリコシド結合を完全に加水分解し、生成するグルコースとイノシトールの含有比を算出することにより行うことができる。

式〔I〕で示される各オリゴ糖のグルコースとイノシトールのモル比は次の通りである。

式〔I〕の $n = 0$ のとき 1/1、 $n = 1$ のとき 2/1、 $n = 2$ のとき 3/1、 $n = 3$ のとき 4/1、 $n = 4$ の

とき $5/1$ 、 $n = 5$ のとき $6/1$ 、 $n = 6$ のとき $7/1$ 、 $n = 7$ のとき $8/1$ 。

(ii) 式[1]の $n > 0$ の各オリゴ糖をグルコアミラーゼ処理すると、グルコースを順次遊離し、最終生成物として $n = 0$ のオリゴ糖が得られる。

のことより、本発明のオリゴ糖を構成する Glc-Glc は α -1,4-グリコシド結合からなることが確認できるとともに (ネイチャー (Nature), 181, 770 (1958) 参照)、イノシトール残基が末端に結合していることが確認できる。

上記により特定されるオリゴ糖は、本発明の第2発明の製造方法により製造することができる。この方法では、サイクロデキストリンとイノシトールをサイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ (以下、CGTase という) の存在下に反応させ、末端にイノシトール残基を結合したグルコオリゴ糖を製造する。

本発明で基質とするサイクロデキストリンは、D-グルコースが α -1,4-グリコシド結合して環状を形成するもので、6個のグルコース残基からな

る α -サイクロデキストリン、7個のグルコース残基からなる β -サイクロデキストリン、または8個のグルコース残基からなる γ -サイクロデキストリンなどがあり、酵素の種類、目的とするオリゴ糖の n の値等に応じていずれを用いててもよい。

本発明の他の基質であるイノシトールは、前述のように特に限定されないが、*myo*-イノシトールが好ましい。サイクロデキストリンとイノシトールの比率はモル比で 1 : 1 ~ 10 程度が好ましい。

上記反応に用いる CGTase (E.C.2.4.1.19) としては本発明の目的を達成できるものであれば、その生産する微生物の種類を問わずに用いることができる。このような CGTase としては、例えばバチルス・オーベンシス (*Bacillus ohensis*)、バチルス・メガテリウム (*B. megaterium*)、バチルス・マセランス (*B. sacerans*)、バチルス・サーキュランス (*B. circulans*)などの菌株の培養物から得られる公知の CGTase を好適に用いることができ、特にバチルス・オーベンシス由来のものが好ましい。反応基質に対する CGTase の添加量は 200 ~ 300

μ /g-基質程度である。

反応条件は用いる CGTase の種類によって若干異なり、特に限定されないが、一般的には温度 30 ~ 70°C、pH 6.0 ~ 7.5、反応時間 1 時間以上、好適には 1 ~ 24 時間の範囲内で選定すればよい。

上記の反応により、CGTase がサイクロデキストリンに作用し、イノシトールを受容体としてグルコース残基の転位が起こり、式[1]の末端にイノシトール残基が結合したグルコオリゴ糖が生成する。このときイノシトールとグルコース残基の結合はグリコシド結合であり、グルコースの 4 位に相当する立体配位を有するイノシトールの水酸基に、供与体であるグルコースの 1 位の残基が結合するものと推定される。また生成するオリゴ糖の n の値は、基質のサイクロデキストリンのグルコース残基数が大きいほど大きくなり、例えば、 γ -サイクロデキストリンを用いた場合には $n = 7$ のオリゴ糖が生成し、順次グルコース残基が遊離して n の値の小さいものが生成する。

こうして反応液中には、末端にイノシトール残

基が結合した構成グルコース残基数の異なるオリゴ糖と、その副反応生成物が混在するので、必要に応じて各オリゴ糖を分離、採取することができる。

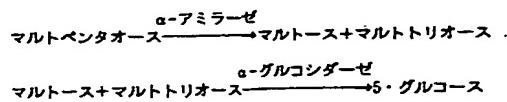
分離、採取手段としては、各種糖類の分離、採取に用いられる公知の手段が利用でき、例えばゲル通過、イオン交換、吸着担体等を用いたクロマトグラフィが挙げられる。

なお、式[1]で示される各オリゴ糖の同定は、上記反応液を分析用 HPLC カラムと同じ分離モードの分取用アミノプロピルカラムで分離し、各分取画分を前述の構成糖確認方法に基づいて同定すればよい。

以上によって製造される式[1]のオリゴ糖は、一般的な生化学的試薬のほか、アミラーゼ活性測定基質、ビフィドバクテリウム菌の増殖促進物質などとして有用である。

一般的にオリゴ糖をアミラーゼ活性測定基質として用いる場合は、例えば、 α -アミラーゼの共役酵素として α -グルコシダーゼを用いると、次

の方法によって α -アミラーゼの活性を測定することができる。



ここで生成したグルコースを、例えばグルコースオキシダーゼ/パーオキシダーゼ/色素系またはヘキソキナーゼ/ホスホグルコムターゼ/グルコース-6-ホスフェートデヒドログナーゼ/NADH系等より定量し、 α -アミラーゼの活性が換算できる。

以上により、本発明のオリゴ糖は從来のマルトベントースに代えて用いることができ、アミラーゼ活性測定基質として有用である。

また上記オリゴ糖をビフィドバクテリウム菌の増殖促進物質として用いる場合は、從来の培養培地に用いられているグルコースに代え、あるいはこのグルコースとともに上記オリゴ糖を培地に加えて培養を行うことにより、ビフィドバクテリウ

ム菌の増殖を促進することができる。

本発明のオリゴ糖は難消化性であるため、これを攝取すると直接腸内に達し、これが腸内のビフィズス菌によって利用されるため、腸内菌叢を正常なバランスに維持することができる。

【発明の効果】

本発明の第1発明によれば、文献未載の新規かつ有用な末端にイノシトール残基を結合したグルコオリゴ糖が得られる。また本発明の第2発明によれば、末端にイノシトール残基を結合したグルコオリゴ糖を簡単な方法で効率よく製造することができる。

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。実施例中、%は特に言及しない限り重量%である。

(1) 末端にイノシトール残基を結合したグルコオリゴ糖の製造

酵素反応基質として、 β -サイクロデキストリン50gとmyo-イノシトール50gを用い、全容が

1000mLとなるよう25mMのマックイルベイン緩衝液(McIlvaine buffer)(pH 6.0)を添加し、パチス・オーベンシス由来のCGTaseを250u/g-基質添加後、60℃にて20時間反応させた。反応終了後、15分間沸騰し、酵素を失活させた。

次いで、この反応液を冷却し、失活した酵素を通過により除去したものをサンプルとして、分取用アミノプロピル基担持シリカ充填カラム(YMC-643、20mmΦ × 250mmL 2本、内容積157mL、山村化学製)を用いてクロマトグラフィにより分離した。クロマトグラフィの条件は次の通りである。

(条件)

サンプル濃度: 2v/v%(蒸留水で希釈)

サンプル注入量: 2.0mL (固体分40mg)

溶離液: CH₃CN/H₂O(1/1; 容量比)

流速: 2mL/min

検出器: RI Detector

上記により得られたクロマトグラムを第4図に示す。

第4図に示す第1のピークはグルコース(含有

率2%)、第2のピークはイノシトール(同21%)であることが分取後のHPLC分析で確認された。第3のピーク以降のものについては、分取後前述の塩酸処理により構成糖を確認した。例えば第4のピークについては分離開始後170分から230分までの間の60分間(120mL)を分取し、この操作を5回繰返して、ピークNo.4域を合計600mL分取した。この液を濃縮、乾固したものを取りだして秤量したところ、サンプル注入量10mL(固体分200mg)から得られた乾固物(=ピークNo.4成分)は44mgであった。この乾固物を1N塩酸10mLによりフラスコ内で溶解し、加熱して沸とうさせた。このときフラスコ上部には冷却管を接続して、液温を維持した。1.5時間後加熱を終了し、冷却した液を再生形アニオン交換樹脂で脱塩した。こうして得たピークNo.4成分の酸加水分解物をHPLC分析したところ、ピークNo.4成分の酸加水分解物は、グルコース63.5%およびイノシトール36.5%からなり、その検出器の感度を補正した重量比(=モル比)は2:1であった。

特開昭63-196596(6)

他のピークについても同様に分取、分析したところ、それぞれ、第3のピークがGlc-Ino(含有率34%)、第4のピークが(Glc)₂-Ino(同22%)、第5のピークが(Glc)₃-Ino(同11%)、第6のピークが(Glc)₄-Ino(同6%)、第7のピークが(Glc)₅-Ino(同3%)、第8のピークが(Glc)₆-Ino(同1%)の各オリゴ糖であることが同定された。得られた各オリゴ糖の理化学的性質は前記の通りである。

(ii) ピフィドバクテリウム菌の増殖促進効果

上記によって得られたオリゴ糖の *in vitro* における腸内菌による変化性を以下の方法により調べた。

ピフィド・バクテリア培地(ポリペプトン1.0%、肉エキス0.5%、酵母エキス0.5%、グルコース1.0%、K₂HPO₄ 0.3%、Tween80 0.1%、pH 7.0)のグルコースを除いた組成よりなる基本培地に、本発明の各オリゴ糖および対照としてその他の糖類を1%濃度にて添加した培地に、代表的なピフィズス菌のピフィドバクテリウム・アドレッセンティス (*Bifidobacterium adolescentis*) JCM

1295の菌液を $10^8 \sim 10^9/\text{ml}$ になるように接種し、37°C、24時間、嫌気培養した。菌の生育は 610nm の吸光度測定により、グルコースの濃度を100として他の糖類における菌の相対増殖度を求めた。その結果を第1表に示す。

第1表 ピフィズス菌の増殖促進効果

試 料	比吸光度(610nm)	相対増殖度
グルコース	0.64	100
(Glc) ₂ -Ino	0.99	155
(Glc) ₃ -Ino	1.24	194
(Glc) ₄ -Ino	0.95	148
(Glc) ₅ -Ino	0.35	55
イノシトール	0.01	1.6
β-サイクロデキストリン	0.01	1.6
無 添加	0.01	1.6

第1表より、本発明のオリゴ糖のうち、(Glc)₂-Ino、(Glc)₃-Ino、(Glc)₄-Inoはグルコースより高い増殖度を示し、ピフィズス菌の増殖促進効果が大きいことがわかる。中でも(Glc)₃-Ino

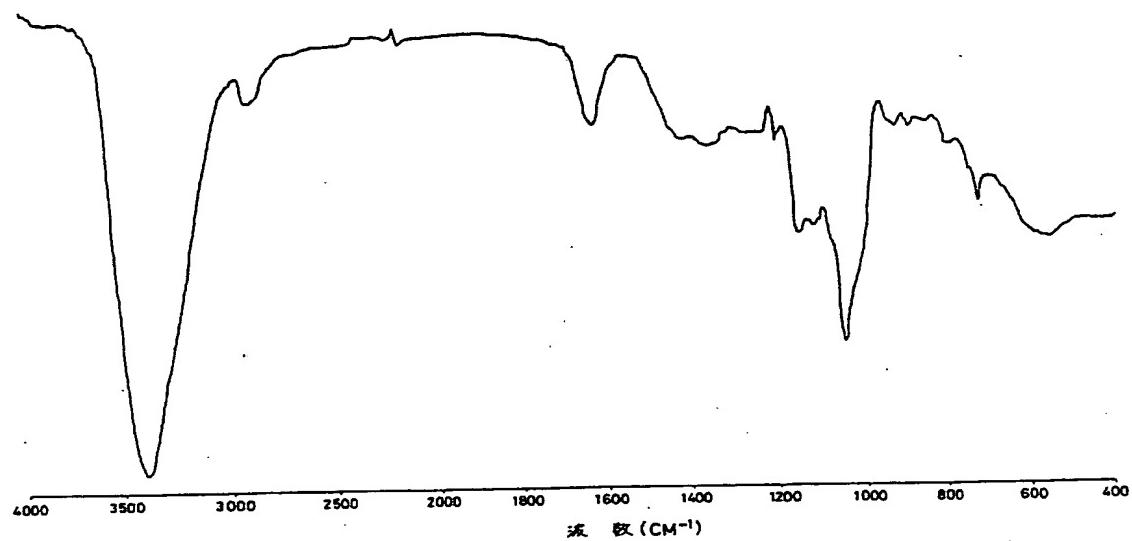
が最も高い効果を示し、グルコースの約2倍の増殖促進効果が認められる。

4. 図面の簡単な説明

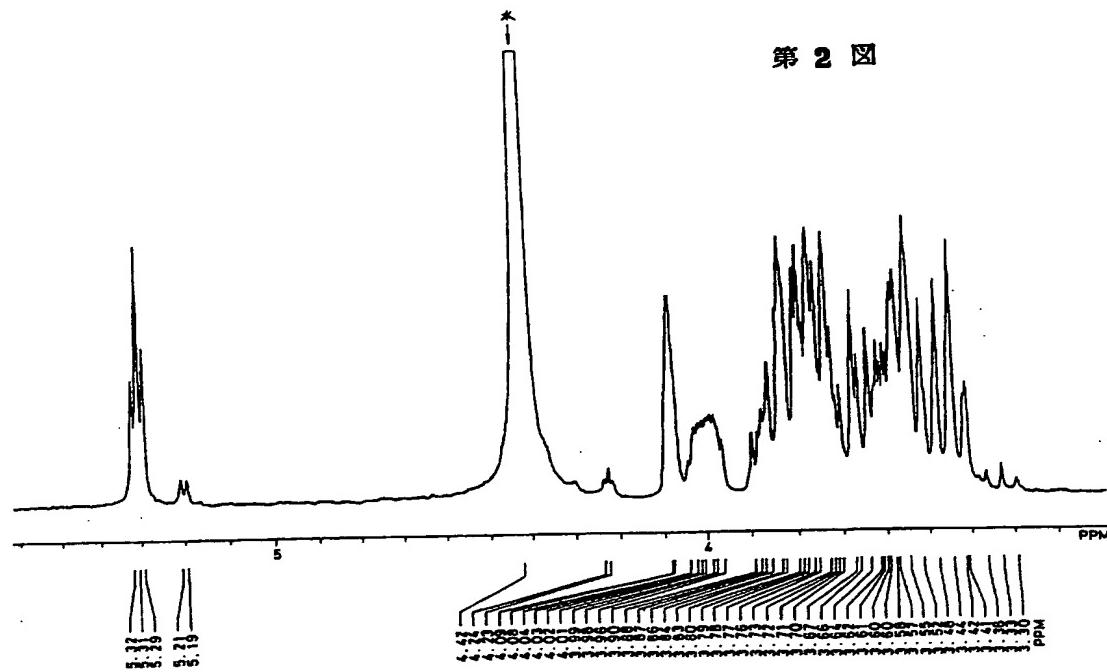
第1図は Glc-Inoの赤外線吸収スペクトログラム、第2図は Glc-Inoのプロトン核磁気共鳴スペクトログラム、第3図は Glc-Inoの ¹³C核磁気共鳴スペクトログラム、第4図は実施例における酵素反応液の分取用HPLCによるクロマトグラムである。

代理人 弁理士 柳 原 成

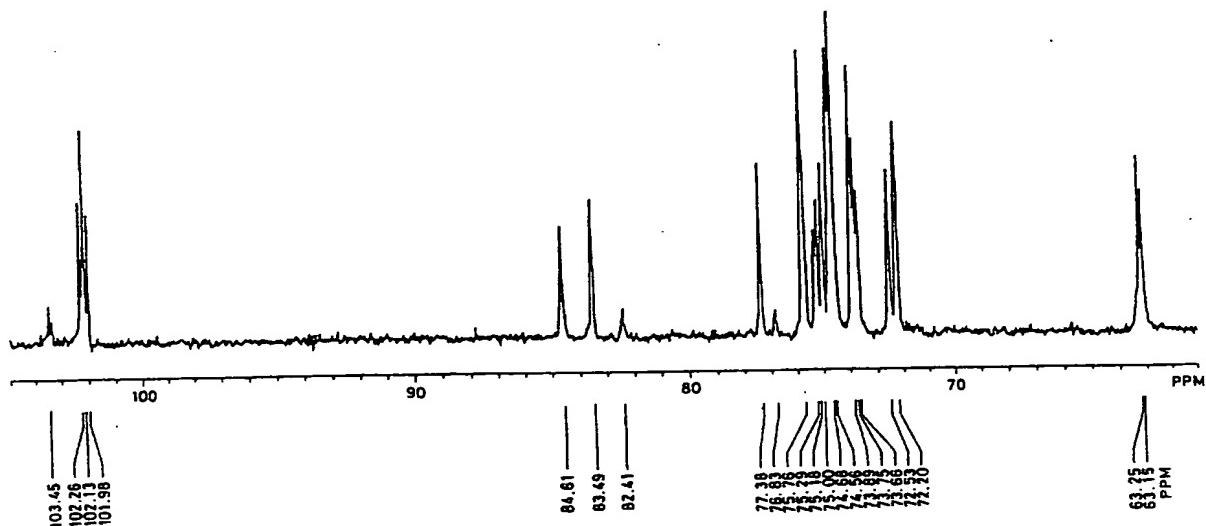
第1図



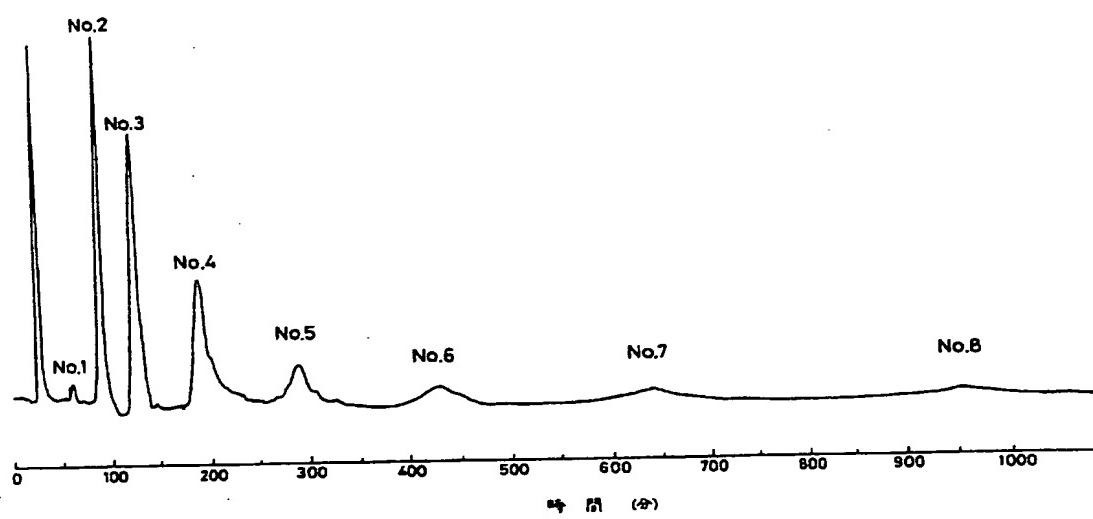
第2図



第3図



第4図



第1頁の続き

⑤Int.Cl.
C 12 P 19/18
//(C 12 P 19/18
C 12 R 1:07)
識別記号 廷内整理番号
7236-4B
⑥発明者 織田 信博 神奈川県厚木市森の里若宮7番1号 栗田工業株式会社総
合研究所内
⑦発明者 奥村 幹治 東京都新宿区西新宿3丁目4番7号 栗田工業株式会社内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.